

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 1 月 16 日 (16.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/004667 A1

(51) 国際特許分類: C12P 7/64, C11C 3/00, A23C 11/04,
A23K 1/16, A23L 1/30, A61K 31/22

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/06702

(22) 国際出願日: 2002 年 7 月 2 日 (02.07.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-201357 2001 年 7 月 2 日 (02.07.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府 大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 40 号 Osaka (JP).

元男 (SUMIDA, Motoo) [JP/JP]; 〒611-0043 京都府宇治市 伊勢田町毛路 100 Kyoto (JP). 東山 堅一 (HIGASHIYAMA, Kenichi) [JP/JP]; 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-602 Osaka (JP). 藤川 茂昭 (FUJIKAWA, Shigeaki) [JP/JP]; 〒569-1022 大阪府高槻市 日吉台 7 番町 17 番 26 号 Osaka (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 秋元 健吾 (AKIMOTO, Kengo) [JP/JP]; 〒618-0001 大阪府 三島郡島本町 山崎 1-9-5-1006 Osaka (JP). 角田

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING FAT COMPRISING TRIGLYCERIDE CONTAINING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID

(54) 発明の名称: 高度不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法

(57) Abstract: A process for producing a fat comprising a triglyceride having a medium-chain fatty acid bonded in each of the 1-position and 3-position and a highly unsaturated fatty acid bonded in the 2-position, which comprises causing a lipase fixed to a porous ion-exchange resin support having a pore diameter of about 100 Å or larger and specifically acting on the 1- and 3-position ester bonds to act on a mixture of a medium-chain fatty acid derivative and a starting-material fat which comprises at least one highly unsaturated fatty acid selected from the group consisting of omega-6 highly unsaturated fatty acids having 18 or more carbon atoms and 3 or more double bonds and omega-9 highly unsaturated fatty acids having 18 or more carbon atoms and 2 or more double bonds but contains no omega-3 highly unsaturated fatty acids; a fat or triglyceride obtained by the process; and a use thereof in a food, feed, and medicinal composition.

[続葉有]

WO 03/004667 A1



(57) 要約:

本発明は炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸を含有し、 ω 3系高度不飽和脂肪酸を含有しない原料油脂と中鎖脂肪酸類の混合物に、孔径が約100オングストローム以上の多孔質イオン交換樹脂担体に固定化された、1, 3位のエステル結合に特異的に作用するリパーゼを作用させることによる、トリグリセリドの1位及び3位に中鎖脂肪酸が、2位に該高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリオを含有する油脂の製造方法及びそれにより得られた油脂またはトリグリセリド並びにその食品、飼料及び医薬組成物への使用に関する。

明 細 書

高度不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法

技術分野

トリグリセリドの1位及び3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含む油脂及びその製造方法、並びにこれらの油脂を含む組成物に関する。

背景技術

ω 3系高度不飽和脂肪酸として、エイコサペンタエン酸（以下「EPA」と称する）、ドコサヘキサエン酸（以下「DHA」と称する）が、動脈硬化症、血栓症などの成人病の予防効果や抗ガン作用、学習能の増強作用など多くの生理機能を有していることが知られ、医薬品、特定保健用食品への利用で様々な試みがなされている。しかし、最近では ω 3系以外の高度不飽和脂肪酸（ ω 6系及び ω 9系）の生理機能に関心が集っている。

ヒトの高度不飽和脂肪酸の生合成経路には、代表的な2つの系列、 ω 3系と ω 6系がある（ ω とは、脂肪酸のメチル基末端から数えて最初の二重結合がある炭素までの数を示している）。そして、 ω 6系高度不飽和脂肪酸としてリノール酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸及びアラキドン酸が知られている。

アラキドン酸は、血液や肝臓などの重要な器官を構成する脂肪酸の約10%程度を占めており（例えば、ヒト血液のリン脂質中の脂肪

酸組成比では、アラキドン酸は11%、エイコサペンタエン酸は1%、ドコサヘキサエン酸は3%を占めている）、細胞膜の主要構成成分として膜の流動性の調節に関与し、体内の代謝で様々な機能を示す一方、プロスタグランジン類の直接の前駆体として重要な役割を果たす。特に最近では、乳幼児栄養としてのアラキドン酸の役割、神経活性作用を示す内因性カンナビノイド（2-アラキドノイルモノグリセロール、アナンダミド）の構成脂肪酸として注目されている。ヒトはリノール酸を生合成することはできないが、植物性食品から摂取して、不飽和化と炭素鎖長の延長が繰り返され、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸へと変換される。したがって、通常はリノール酸を富む食品を摂取すればアラキドン酸は十分生合成される。しかし、成人病患者やその予備軍、乳児、老人では生合成に関与する酵素の働きが低下し、これらアラキドン酸は不足しがちとなり油脂（トリグリセリド）の構成脂肪酸として、直接に摂取することが望まれる。

一般に油脂（トリグリセリド）を摂取し、小腸の中に入ると腓リパーゼで加水分解されるが、この腓リパーゼが1,3-位特異性であり、トリグリセリドの1,3-位が切断されて2分子の遊離脂肪酸ができ、同時に1分子の2-モノアシルグリセロール（以下「2-MG」と称す）が生成する。この2-MGは非常に胆汁酸溶解性が高く吸収性が高いため、一般に2-位脂肪酸の方が吸収が良いと言われる。また、2-MGは胆汁酸に溶けると界面活性剤的な働きをして、遊離脂肪酸の吸収を高める働きをする。次に遊離脂肪酸と2-MGはコレステロールやリン脂質等と一緒に胆汁酸複合ミセルを生成して小腸の上皮細胞に取り込まれ、トリアシルグリセロールの再合成が起こり、最終的にはカイロミクロンとしてリンパに放出されていく。

ところが、アラキドン酸を必要とする人は、同時に、油脂（トリ

グリセリド) 吸収の第一段階である腓リパーゼも弱く (例えば加齢と共に腓リパーゼ活性が低下することも知られており)、アラキドン酸を含む食品・油脂 (微生物発酵油脂であるアラキドン酸含有油脂も含む) からではアラキドン酸を十分量、吸収することができなかった。

そこで、腓リパーゼで加水分解されやすい中鎖脂肪酸をトリグリセリドの1,3-位に結合させて、2-位にアラキドン酸を結合させたトリグリセリドは、アラキドン酸を必要とするヒトに最適な油脂 (トリグリセリド) となる。特開平8-214891号公報には、高度不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法として、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの製造法が開示されているが、具体的にはEPAあるいはDHAが2-位に結合したトリグリセリドの製造法が記載されているだけであって、アラキドン酸が2-位に結合したトリグリセリドの具体的な製造法は何ら開示されていない。

特開2000-270885号公報には、トリグリセリドの1,3位に特異的に作用するリパーゼを作用させて、目的物であるトリグリセリドの1位及び3位に結合する脂肪酸の炭素数が12以下であり、かつ、2位に結合する脂肪酸の90%以上が高度不飽和脂肪酸である構造脂質を製造する方法が開示されている。ここでリパーゼを作用させる油脂は、例えば、98%以上がEPAトリグリセリドのトリグリセリドであり、これはグリセリンおよび高度不飽和脂肪酸あるいはその低級アルコールエステルに、位置特異性のないリパーゼを作用させ、脱水しながら合成される。しかしながら上記方法では、混合物ではなく高純度の高度不飽和脂肪酸あるいはその低級アルコールエステルが必要であるが、未だこれらを安価に得ることは困難な状況であり、従って上記方法で目的物を製造することは現実的ではない。

一方、発酵法により高度不飽和脂肪酸を含有する油脂（トリグリセリド）を安価に製造する方法が知られている。この微生物油を利用してYuji Shimada (Journal of Fermentation and Bioengineering, 83, 321-327 (1997)「Fatty Acid Specificity of Rhizopus d
elemar Lipnase in Acidolysis」)には、当時入手可能であったアラキドン酸を25質量%含有する微生物油を基質として、1,3位特異的リパーゼにより、1位及び3位にカプリル酸を結合させたトリグリセリドの製造方法が開示されている。しかしながらこの微生物油のトリグリセリドに結合するアラキドン酸の位置はランダムであり、1,3位の脂肪酸を酵素でほぼ完全にカプリル酸に置き換えたとしても、得られた油脂中に占める1,3-カプリロイル-2-アラキドノイル-グリセロール（以後「8A8」とも称す）の割合は、最大でも原料油の2位に結合しているアラキドン酸の割合を越えることはない。この場合、2位に結合するアラキドン酸の割合は最大で25質量%であり、実際にはアラキドン酸が複数個結合したトリグリセリドも存在しており、2位に結合するアラキドン酸の割合は25質量%以下となる。島田らの報告 (Journal of Fermentation and Bioengineering, 83, 321-327 (1997))では、得られたトリグリセリドを高速液体クロマトグラフィーで分析しているが8A8と、1,3-カプリロイル-2-γ-リノレノイル-グリセロール（以後「8G8」と称す）及び1,3-カプリロイル-2-ジホモ-γ-リノレノイル-グリセロール（以後「8D8」と称す）の保持時間が同じであるため、トリグリセリド中の8A8の割合を正確に求めるにはいたっていない。しかしながら、8A8, 8G8及び8D8の合計でも20mol%前後であって、8A8を25mol%以上含むような満足できるトリグリセリドではなかった。

このように微生物油を原料とする場合、トリグリセリドに結合するアラキドン酸の位置がランダムであるため、目的とする8A8の割

合を高めるにはよりアラキドン酸含有の高いトリグリセリドを原料とする必要がある。

しかし、1,3位特異的リパーゼの、脂肪酸に対する反応性は、炭素鎖長が長いほど、二重結合が多いほど低くなる。またカルボキシル基から数えて何番目から二重結合が入るかという、二重結合の位置もリパーゼの反応性を議論する時に、重要な要素となる。たとえばリパーゼは、 α -リノレン酸（9,12,15-オクタデカトリエン酸）に対し反応性は高いが、 γ -リノレン酸（6,9,12-オクタデカジエン酸）には反応性は非常に低く、またDPA ω 3（7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸）には反応性は高いが、DPA ω 6（4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸）には反応性は非常に低い。すなわちリパーゼは炭素数が18以上で、 ω 6系不飽和脂肪酸の場合は二重結合が3以上、 ω 9系不飽和脂肪酸の場合は二重結合が2以上の不飽和脂肪酸に対して反応性が低いという問題点がある。従ってトリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合した目的のトリグリセリドをより高濃度に含有する油脂を得るためには、原料油脂として炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸をより高濃度に含有する油脂を用いる必要があるが、その含量が高ければ高いほど、反応性が低くなり、反応収率が悪くなってしまう。そしてこの反応収率の低下は、多量の未反応トリグリセリド（原料トリグリセリド並びに1,3-位の脂肪酸のうち一方のみが中鎖脂肪酸となったトリグリセリド）を生じ、結果として目的とするトリグリセリドの割合を高めることはできない。従って目

的とするトリグリセリドの割合を高めるための実用的な方法の開発が強く望まれている。

ω 6系高度不飽和脂肪酸のジホモ- γ -リノレン酸は、その単独の生理作用として、プロスタグランジンI類の前駆体効果、抗血栓作用、血圧低下作用、抗運動障害作用、抗炎症作用、遅延型アレルギー抑制効果、皮膚保護作用、抗ガン作用などが期待される。したがって、同じく1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にジホモ- γ -リノレン酸が結合したトリグリセリドの開発が望まれていたが、ジホモ- γ -リノレン酸の含有率の高い油脂（トリグリセリド）の存在が知られておらず、目的とするトリグリセリドの製造に関する知見は全く知られていなかった。

ω 9系高度不飽和脂肪酸の脂肪酸、例えば5,8,11-エイコサトリエン酸(20:3 ω 9: 以下「ミード酸」ともいう)及び8,11-エイコサジエン酸(20:2 ω 9)は、必須脂肪酸欠乏に陥った動物組織に構成脂肪酸のひとつとして存在することが知られている。しかしながら、その含量はわずかであるため単離精製は非常に困難であった。これら高度不飽和脂肪酸は生体内でロイコトリエン3グループの前駆体になることが可能で、その生理活性が大いに期待されており、抗炎症、抗アレルギーおよび抗リウマチ作用が報告されている（特開平7-41421号公報）。したがって、同じく1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位に ω 9系高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの開発が望まれていたが、 ω 9系高度不飽和脂肪酸の含有率の高い油脂（トリグリセリド）の存在が知られておらず、目的とするトリグリセリドの製造に関する知見は全く知られていなかった。

発明の開示

トリグリセリドの1位及び3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18

以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含有する油脂及びその製造方法、並びにこれらの油脂を含む組成物を提供しようとするものである。

本発明者等は、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを25mol以上含む油脂を製造する目標を達成するために、まず、アラキドン酸を40質量%以上含有する油脂（トリグリセリド）の工業的な製造法を鋭意研究した結果、驚くべきことに、培地炭素源濃度を制御することでアラキドン酸を45%質量以上含有する油脂（トリグリセリド）を得た；

さらに、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを高含有率で含む油脂を製造する目標を達成するために、鋭意研究した結果、アラキドン酸生産菌の変異株によってジホモ- γ -リノレン酸、または ω 9系高度不飽和脂肪酸を高含有する油脂（トリグリセリド）を得た；

さらに、酵素反応効率の向上を目指して鋭意研究した結果、驚くべきことに反応温度を高くすることで反応効率を高めることに成功した；

さらに、固定化担体を選択することで熱安定性の高い固定化酵素の取得に成功し、高い反応温度での使用を可能とし、実用化に適した酵素反応を完成した；ことにより、本発明を完成した。またこれらの方法は実験室での結果を容易にスケールアップすることが可能であり、上記油脂の商業的生産に適した方法を提供するものである。

従って、本発明は、トリグリセリドの1位及び3位に中鎖脂肪酸が

、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含有する油脂及びその製造方法、並びにこれらの油脂を含む組成物を提供する。

本発明により、例えば、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを25mol%以上含む油脂、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にジホモ- γ -リノレン酸が結合したトリグリセリドを含む油脂、あるいは1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位に ω 9系高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含む油脂を製造することができ、これらの油脂の多くの生理機能により、医薬品、特定保健用食品などに広く利用することができ、産業上極めて有用である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、高度不飽和脂肪酸を含有する油脂（トリグリセリド）の1,3-位を構成する長鎖脂肪酸を中鎖脂肪酸にエステル交換することで、1,3-位に中鎖脂肪酸、2-位に高度不飽和脂肪酸を結合せしめたトリグリセリドを含有する油脂を製造する方法並びに1,3-位に中鎖脂肪酸、2-位に高度不飽和脂肪酸を結合せしめたトリグリセリドを含有する油脂に関する。

本発明において、原料となる油脂（トリグリセリド）中の高度不飽和脂肪酸の割合の増加に伴う、未反応油脂（原料トリグリセリド並びに1,3-位の脂肪酸のうち一方のみが中鎖脂肪酸となったトリグリセリド）の増加による反応収率の低下を防ぐため、酵素反応温度は30～50℃とし、好ましくは40～50℃とする。

本発明で用いることのできるトリグリセリドの1,3位のエステル

結合に特異的に作用するリパーゼとして、例えば、リゾプス (Rhizopus) 属、リゾムコール (Rhizomucor) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属などの微生物が産生するもの、ブタ膵臓リパーゼなどを挙げるができる。かかるリパーゼについては、市販のものを用いることができる。例えば、リゾプス・デレマー (Rhizopus delemar) のリパーゼ (田辺製薬 (株) 製、タリパーゼ)、リゾムコール・ミーハイ (Rhizomucor miehei) のリパーゼ (ノボ・ノルディスク (株) 製、リボザイムIM)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) のリパーゼ (天野製薬 (株) 製、リパーゼA) 等が挙げられるが、これら酵素に限定しているわけではなく、1,3-位特異的リパーゼであればすべて使用することができる。

上記リパーゼの使用形態は、反応収率を高める目的で反応温度を30℃以上、好ましくは40℃以上とするため、酵素に耐熱性を付加する目的で固定化担体に固定化したリパーゼを使用する。固定化担体として、セライト、セラミックが用いられていたが、本発明では耐熱性を付加するのに適した固定化担体を検討した結果、多孔質で、孔径が約100オングストローム以上であるイオン交換樹脂が有効であることを確認した。

本発明者は、次のような過程により、上記固定化担体を選択した。すなわち、蛋白質の精製にはイオン交換樹脂が用いられており、その原理はイオン結合で蛋白質を吸脱着することにより、蛋白質を分画している。この原理を利用し、本発明者は、蛋白質である酵素をイオン交換樹脂に吸着して固定化できると考えた。蛋白質の精製には親水性の樹脂担体、すなわちセルロースやセファロース等の多糖型の担体が主流に使われている。しかしながら、油脂のエステル変換にはこの親水性は邪魔になる。そこで鋭意検討の結果、親油性に優れると考えられるポリマー型やセラミック型の樹脂がこの選択

にあうものと考えた。これらのイオン交換樹脂は主に水処理に用いられていて酵素の吸着精製には用いられるものではなかった。次にイオン交換樹脂には陽イオン交換型と陰イオン交換型に分別される。目的のリパーゼの酵素群を両イオン交換体に吸着させたところ、陰イオン交換型に良く吸着されることが解った。さらに陰イオン交換型のポリマー樹脂に酵素吸着させたところ、ゲル型よりむしろポリマー型の陰イオン交換樹脂に多くの酵素が吸着され、高活性の酵素を固定することができた。これらポリマー型の樹脂は原料のスチレン、ビニルベンゼン、フェノール類、アクリル類、可塑剤等の組み合わせにより、孔径（ポアサイズ）を変化させることが出来る。このような陰イオン交換樹脂には弱塩基性と強塩基性のものがあり、代表的な陰イオン交換樹脂を用いて行った検討結果を示す。

以下に示すアラキドン酸を40質量%含有する微生物油脂（トリグリセリド95%以上含有）とカプリル酸を酵素反応させ、2日間40℃で反応後にトリグリセリド中に取り込まれたカプリル酸の量（mol%）で酵素活性の高低を比較した。反応条件は下記のとおりであった。

アラキドン酸含有油脂（SUNTGA40S）	1.33g
カプリル酸	2.66g
固定化酵素類	0.2g

40℃、振とう、48時間反応

（分析）

反応終了後、反応液と固定化酵素を分け、反応液をアルカリ性ヘキサン抽出した。抽出されたトリグリセリド画分の一部をナトリウムメチラートでメチル化し、脂肪酸メチルエステルを得た。得られ

た脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー (GC) で分析し、カプリル酸メチルの量を測定した。原料のアラキドン酸含有油脂にはカプリル酸が含まれていないので酵素活性で取り込まれたカプリル酸がこのGCで測定できる。このようにして、酵素活性は反応終了後のGC分析値のカプリル酸の割合 (mol%) で表示した。

固定化酵素担体	タイプ	8:0 (カプリル酸)
Dowex MARATHON WBA	弱陰イオン性、多孔	50.9
Dowex MARATHON A	強陰イオン性、ゲル	42.1
SM-10	セラミック	48.7
Amberlite IRA904	強陰イオン性、多孔	33.5
ダイヤイオン WA 10	弱陰イオン性、ゲル	40.1
ダイヤイオン WA 30	弱陰イオン性、多孔	49.8

上記において、ダウケミカル社のイオン交換樹脂では、100から1000オングストロームの孔径のものをマクロポーラス型、100オングストローム以下をゲル型と定義しており、三菱化学株式会社では、300オングストローム以上の孔径のものをマクロポーラス型と定義している。したがって、Dowex MARATHON WBA (商標、ダウケミカル) は、100オングストローム以上の孔径を有するイオン交換樹脂である。

良好な結果を示したDowex MARATHON WBA (商標、ダウケミカル) の性質を確認してみると以下の点が有効であることが判明した。

1. 孔径 (ポアサイズ) が100オングストローム以上の多孔性の樹脂である。

2. Dowex MARATHON WBA (商標、ダウケミカル) とDowex MARAT

HON A（商標、ダウケミカル）との比較およびダイヤイオン WA 10（商標、三菱化学）とダイヤイオン WA 30（商標、三菱化学）との比較から、多孔型の有利性がゲル型を上回る。

3. Dowex MARATHON WBA（商標、ダウケミカル）とDowex MARATHON Aとの比較から、陰イオン交換基を持つことにより固定化酵素の調製は出来るが、より好ましい高活性体を製造するには強塩基性より弱塩基性の陰イオン交換基を持つ方が有利である。

4. Amberlite IRA904（商標、ローム・アンド・ハース）はイオン交換容量がDowex MARATHON WBA（商標、ダウケミカル）に比して少ないため更に活性が低くなった。

これらから、好ましい固定化担体の性質はゲル型よりむしろ、100オングストローム以上の多孔を有する多孔質（ハイポラス）樹脂であり、好ましくは強塩基性より弱塩基性の陰イオン交換基を持つ担体で、高いイオン交換容量をもつ担体が好適である。

さらにこの担体は脂質の酵素変換に用いる性質上、親油性の性質を有することが望ましい。酵素反応が油脂中で起こるため、原料の油脂類が親油性の樹脂中に入ることにより多孔中に固定化された酵素も反応に参加でき、反応の速度が速くなり、反応効率が良くなる。延いては、熱に対して不安定な酵素が反応中に熱にさらされる時間が短縮され、酵素の延命につながるとともに、生産性の上昇にもつながる好適な方法と言える。

上記のイオン交換樹脂は一例であり、樹脂は日々進化し、より良いものが市場に出回ってくる。この範疇の改良型が出回った場合、Dowex MARATHON WBA（商標、ダウケミカル）等と同等もしくはそれ以上の活性を有することは明らかなものと考ええる。

本明細書においては、イオン交換樹脂として、Dowex MARATHON WBA（商標、ダウケミカル）を用いているが、この固定化担体に限定

しているわけではなく、これと同等またはそれ以上の耐熱性を付加できるイオン交換樹脂であればすべて使用することができる。

また本発明は、耐熱性を有する固定化酵素を使用し、1,3-位特異的リパーゼの反応性の低い高度不飽和脂肪酸を含有する油脂においても、反応効率を低下させることなく、かつ位置特異性を保持し、目的とする1,3-位に中鎖脂肪酸を、2-位に高度不飽和脂肪酸をエステル結合させたトリグリセリドを効率的に製造することを目指している。したがって、固定化担体の選択以外の耐熱性を付加する方法も併用することができ、例えば、固定化酵素に架橋剤、例えばゲニピン架橋剤を処理することにより、より高い耐熱性を付加することも可能である。

固定化担体1に対して、0.5～20質量倍の1,3-位特異的リパーゼの水溶液に固定化担体を懸濁し、懸濁液に対して2～5倍量の冷アセトン（例えば-80℃）を攪拌しながら徐々に加えて沈殿を形成させる。この沈殿物を減圧下で乾燥させて固定化酵素を調製することができる。さらに簡便な方法では、固定化担体1に対して、0.05～0.4倍量の1,3-位特異的リパーゼを最小限の水（酵素がぎりぎり溶ける量の水）に溶解し、攪拌しながら固定化担体を混ぜ合わせ、減圧下で乾燥させて固定化酵素を調製することができる。この操作により約90%のリパーゼが担体に固定化されるが、このままではエステル交換活性は全く示さず、水1～10%を加えた基質（原料油脂と中鎖脂肪酸類）中で、好ましくは水1～3%を加えた基質中で前処理することで固定化酵素は最も効率よく活性化することができ本発明に供することができる。

酵素の種類によっては、本反応系に加える水分量は極めて重要で、水を含まない場合はエステル交換が進行しにくくなり、また、水分量が多い場合には加水分解が起こり、グリセリドの回収率が低下

する（加水分解が起こればジグリセリド、モノグリセリドをつくる）。しかし、この場合、前処理により活性した固定化酵素を使用することで、本反応系に加える水分量は重要ではなくなり、全く水を含まない系でも効率よくエステル交換反応を起こすことができる。さらに酵素剤の種類を選択することで水による固定化酵素の活性化処理を省略することも可能である。

本発明においてリパーゼの基質となる原料油脂とは、炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸を含有し、 ω 3系高度不飽和脂肪酸を含有しない油脂であり、該油脂としてはトリグリセリドを80質量%以上、好ましくは90質量%以上、より好ましくは95質量%以上含有する油脂を用いることができる。

本発明は、耐熱性を有する固定化酵素を使用し、酵素反応温度を上げることで、反応性の低い高度不飽和脂肪酸を含有する本発明の油脂においても、反応効率を低下させることなく、目的とするトリグリセリドを効率的に製造することができる。従って本発明において、油脂中の炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸の全量が、該油脂中の全脂肪酸に対して30質量%以上あるいは42質量%以上あるいは50質量%以上である油脂であっても使用することができる。なお炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸としては、例えばアラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸が、炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸としては、例えば6,9-オクタデカジエン酸、8,11-エイコサジエン酸、5,8,11-エイコサトリエン酸が挙げられる。

また原料油脂中、同一の高度不飽和脂肪酸の含量が高ければ高いほど、トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に該高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドをより高濃度で含有する油脂を得ることができる。具体的には油脂中の全脂肪酸質量に対して同一の高度不飽和脂肪酸を15質量%以上、好ましくは25質量%以上、より好ましくは30質量%以上含有する油脂を使用することができる。より具体的には油脂中の全脂肪酸に対してアラキドン酸を25質量%以上、好ましくは30質量%以上、より好ましくは40質量%以上、さらに好ましくは45質量%以上、最も好ましくは50質量%以上含有する油脂を使用することができる。

また本発明の原料油脂として、微生物によって生産される油脂を使用することができる。微生物としては炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸を主にトリグリセリドの構成脂肪酸として生産する微生物が好ましい。

アラキドン酸生産能を有する微生物としては、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クロドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、サプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物を挙げることができる。モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物では、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレ

ラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) 等を挙げる事ができる。具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IF08571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等の菌株を挙げる事ができる。

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) 及び、Centrralbureau v oor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明の研究グループが土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の

ラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエセラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエセラ・アルピナ (Mortierella alpina) 等を挙げることができる。具体的にはモルティエセラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IF08570、モルティエセラ・エキシグア (Mortierella exigua) IF08571、モルティエセラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IF05941、モルティエセラ・アルピナ (Mortierella alpina) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等の菌株を挙げることができる。

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) 及び、Centrralbureau v oor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明の研究グループが土壌から分離した菌株モルティエセラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の

無機窒素源を用いることができる。この他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~40質量%、好ましくは1~25質量%の濃度とするのが良い。初発の窒素源添加量は0.1~10質量%、好ましくは0.1~6質量%として、培養途中に窒素源を流加しても構わない。

すでに、モルティエラ属モルティエラ亜属に属する菌株を利用したアラキドン酸含有油脂の工業的製造法は確立している（「Enhancement of Arachidonic Acid Production by Mortierella alpina 1S-4」：J. Am. Oil Chem. Soc., 75, p.1501-1505 (1998)、「Effects of Mineral Addition on the Growth Morphology of and Arachidonic Acid Production by Mortierella alpina 1S-4」：J. Am. Oil Chem. Soc., 75, p.1815-1819 (1998)）。しかし、全脂肪酸に対するアラキドン酸の割合は最大45質量%であり、本発明の8A8を25mol%以上含む油脂（トリグリセリド）、さらには30mol%以上含む油脂（トリグリセリド）を酵素法で製造するには、原料油脂のアラキドン酸が45質量%以上であることが望ましい。アラキドン酸の割合を高める有効な手段として、培地中の炭素源を枯渇させる方法がある。培地中の炭素源が枯渇すると菌は蓄積した油脂を資化し、しかも飽和脂肪酸から資化するため、結果としてトリグリセリド中のアラキドン酸の割合は高くなる。理屈ではこのようなことが考えられるが、実際にはトリグリセリドを資化するためアラキドン酸を高含有する油脂（トリグリセリド）の生産量はごくわずかとなり、反応基質を供給するための製造法としては全く実用的でなかった。そこで、培地炭素源濃度を制御することでアラキドン酸を45質量%以上含有する油脂（トリグリセリド）を工業的に生産することに成

功した。培養は、培養2～4日目までが菌体増殖期、培養2～4日目以降が油脂蓄積期となる。初発の炭素源濃度は1～8質量%、好ましくは2～4質量%の濃度とし、菌体増殖期および油脂蓄積期初期の間のみ炭素源を逐次添加し、逐次添加した炭素源の総和は2～20質量%、好ましくは5～15質量%とする。なお、菌体増殖期の炭素源の逐次添加量は、初発の窒素源濃度に応じて添加し、培養7日目以降、好ましくは培養6日目以降、より好ましくは培養4日目以降の培地中の炭素源濃度を0となるようにすることで、目的とするアラキドン酸を45質量%以上含有する油脂（トリグリセリド）の工業的な生産法を確立した。

アラキドン酸生産菌の培養温度は使用する微生物によりことなるが、5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理によっても、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の割合を上昇せしめることができる。培地のpHは4～10、好ましくは5～9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～30日間、好ましくは5～20日間、より好ましくは5～15日間行う。

アラキドン酸含有油脂中のアラキドン酸の割合を高める手だてとして、培地炭素源濃度を制御する以外に、アラキドン酸含有油脂に選択的加水分解を行ってアラキドン酸高含有油脂を得ることもできる。この選択的加水分解に用いられるリパーゼはトリグリセリドの位置特異性はなく、加水分解活性は二重結合の数に比例して低下するため、高度不飽和脂肪酸以外の脂肪酸のエステル結合が加水分解される。そして、生じた高度不飽和脂肪酸部分グリセリド間でエステル交換反応が起こるなどして、高度不飽和脂肪酸が高められたトリグリセリドとなる（「Enhancement of Archidonic: Selective H

ydrolysis of a Single-Cell Oil from Mortierella with Candida cylindracea Lipase」: J. Am. Oil Chem. Soc., 72, p.1323-1327 (1998))。このように、アラキドン酸含有油脂に選択的加水分解を行って得たアラキドン酸高含有油脂を本発明の原料油脂として使用することもできる。なお、アラキドン酸の含有率が25質量%以上、好ましくは30質量%以上、より好ましくは40質量%以上、さらに好ましくは45質量%以上、最も好ましくは50質量%以上であれば、本発明の原料油脂として使用することができるのであって、明細書記載の方法で得たものに限定しているわけではない。

さらに、本発明は、ジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸を含有する油脂（トリグリセリド）も原料油脂として使用することができる。

すでに、ジホモ- γ -リノレン酸を含有する油脂（トリグリセリド）を効率よく製造する方法が本発明者らによって開発されている（特開平5-91887号公報）。さらに ω 9系高度不飽和脂肪酸（6,9-オクタデカジエン酸(18:2 ω 9)、8,11-エイコサジエン酸(20:2 ω 9)若しくは5,8,11-エイコサトリエン酸(20:3 ω 9))を含有する油脂（トリグリセリド）を効率良く製造する方法についても、モルティエラ属モルティエラ亜属の属する微生物に変異処理を施して得られる、 Δ 12不飽和化酵素が低下又は欠失している変異株を用いて ω 9系高度不飽和脂肪酸を含有する油脂を製造する方法が本発明者らによって開発されている（特開平5-91888号公報、特開平10-57085号公報、特開平5-91886号公報）。しかしながら、これら高度不飽和脂肪酸を含有する油脂を原料に、1,3-位に中鎖脂肪酸、2-位にジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸が結合した油脂（トリグリセリド）を製造することに関しては何らなされておらず、本発明において初めて製造することに成功した。なお、アラキ

ドン酸含有油脂中のアラキドン酸の割合を高める手立てとして用いた、培地炭素源濃度を制御する方法並びにアラキドン酸含有油脂を選択的加水分解してアラキドン酸高含有油脂を得る方法で、ジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸の割合を高めた油脂を原料油脂として使用することもできる。

本発明に使用される中鎖脂肪酸は、炭素数6～12個を有する脂肪酸から選ばれたものが利用できる。炭素数6～12個を有する中鎖脂肪酸として、例えば、カプリル酸又はカプリン酸を挙げることができる。本発明の中鎖脂肪酸類には、遊離の中鎖脂肪酸、さらにその低級アルコールエステル、さらには炭素数6～12個の脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂が含まれ、いずれの形態も使用することができる。

本発明は、活性の劣化が起こらない耐熱性を有する固定化酵素を使用することで、反応温度を上げることが可能となり反応収率を高めたが、上記エステル交換反応を繰り返し行うことにより反応収率をさらに高めることもできる。具体的には、原料油脂と中鎖脂肪酸類の混合物に固定化酵素を作用させて得られる反応生成物から固定化酵素（耐熱性が付加されたリパーゼ）を回収し、精密蒸留もしくはアルカリ性ヘキサン抽出等により遊離脂肪酸を取り除き、次に、得られた油脂に中鎖脂肪酸類を加え、前回回収した固定化酵素を作用させて反応生成物を得る。この方法により反応効率が上昇し、1,3-位に中鎖脂肪酸が結合したトリグルセリドを80%以上含有する油脂を得ることができる。上記工程の反応回数に制限はなく、酵素が失活しないかぎり何回でも繰り返すことが可能である。

本発明の酵素反応は1,3-位に中鎖脂肪酸、2-位に高度不飽和脂肪酸を結合せしめたトリグリセリドが得られる限りバッチ式であっても、連続式であっても構わない。さらに、バッチ式では、固定化リ

パーゼは活性が失活しないかぎり、回収して何度でも使用することができる。

本発明の反応生成物から、目的とする1,3-位に中鎖脂肪酸、2-位に高度不飽和脂肪酸を結合せしめたトリグリセリドを含む油脂（トリグリセリド）を得るには、まず反応生成物から固定化酵素を分離し、次に、この反応油脂から、エステル交換のときに切り出された原料油脂（トリグリセリド）の1,3-位に結合していた脂肪酸、さらには過剰の反応基質である中鎖脂肪酸を取り除くことにより得られる。該脂肪酸や中鎖脂肪酸を取り除く方法としては、定法のアルカリ脱酸、水蒸気蒸留、真空精密蒸留、カラムクロマトグラフィー、溶剤抽出のいずれか又はこれらを組み合わせて用いることができる。なお生産スケールのような大量の油脂から、該脂肪酸や中鎖脂肪酸を取り除く場合には、精密蒸留で除くことが好ましい。

このようにして遊離脂肪酸を取り除いた後、得られる油脂は、95%以上がトリグリセリドの油脂であり、油脂中に数%存在するジグリセリドやモノグリセリドを精密蒸留処理等によって取り除き、トリグリセリドの含量をさらに高めることもできる。また必要に応じ、例えば脱酸、脱ガム、脱色、脱臭等の通常の油脂の精製処理を施してもよい。

本発明の油脂は、トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを30～90mol%、好ましくは30～80mol%、より好ましくは45～80mol%、最も好ましくは60～80mol%含有する油脂が挙げられ、2位に結合している高度不飽和脂肪酸として、例えばアラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、6,9-オクタジエン酸、8,11-エイコサジエン

酸、5,8,11-エイコサトリエン酸が挙げられる。またより具体的には、トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを25mol%以上、好ましくは30mol%以上、より好ましくは40mol%以上含有する油脂や、トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位にジホモ- γ -リノレン酸が結合したトリグリセリドを5mol%以上、好ましくは10mol%以上、より好ましくは20mol%以上含有する油脂、あるいはトリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に5,8,11-エイコサトリエン酸が結合したトリグリセリドを5mol%以上、好ましくは10mol%以上、より好ましくは20mol%以上含有する油脂が挙げられる。

上記本発明の油脂、例えば、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを25mol%以上含む油脂、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にジホモ- γ -リノレン酸が結合したトリグリセリドを含む油脂、あるいは1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位に ω 9系高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含む油脂等の用途に関しては無限の可能性があり、食品、飲料、化粧品、医薬品の原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

例えば、食品組成物としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品又は老人用食品等を挙げることができる。油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。さらに、油脂を含まない、農産食品、醗酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加

することができる。さらに、機能性食品・医薬品の形態であっても構わなく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってもよい。

次に、例により、本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、例に限定されない。

例 1

(1,3-位特異的リパーゼの固定化による耐熱性の付加)

イオン交換樹脂担体 (Dowex MARATHON WBA: ダウケミカル) 100g を、Rhizopus delemar リパーゼ 12.5% 水溶液 (タリパーゼ粉末: 田辺製薬 (株)) 80ml に懸濁し、減圧下で乾燥させて固定化リパーゼを得た。また別の固定化担体として、セラミック担体 (SM-10: 日本ガイシ) 25g を、Rhizopus delemar リパーゼ 10% 水溶液 (タリパーゼ粉末: 田辺製薬 (株)) 100ml に懸濁し、300ml の冷アセトン (-80℃) を攪拌しながら徐々に加えて沈殿を形成させた。そして、この沈殿物を減圧下で乾燥させて固定化リパーゼを得た。

次に、アラキドン酸を 40 質量% 含有する微生物油 (トリグリセリド 95% 以上含有) (SUNTGA40S: サントリー (株)) 4g、カプリル酸 8g、上記固定化リパーゼ 600mg、水 240 μ l を 30℃ で 48 時間、攪拌 (130rpm) しながら反応させた。反応終了後、反応液を取り除き、活性化された固定化リパーゼを得た。

以下、例 2、3、4、5 および 7 においては、上記活性化された固定化リパーゼを用いた。

例 2

(固定化酵素の長期反応後の安定性)

アラキドン酸を 25 質量% 含有する微生物油 (トリグリセリド 95% 以上含有) SUNTGA25 (サントリー (株) 製) 4g とカプリル酸 8g の混合物 (基質) に、固定化酵素 (Rhizopus delemar リパーゼ、担体 Do

wex MARATHON WBAあるいはSM-10) 0.48gを加え30℃で48あるいは72時間、攪拌(130rpm)して反応させ、反応生成物から反応油脂を取り除き、新たに基質を加え、前記と同様の反応させることを80日間、繰り返し行った。この長期反応後、回収した固定化酵素に、先と同様の基質を加え30℃で48時間反応し、反応終了後に反応油脂からアルカリ性ヘキサン抽出によりトリグリセリドを抽出した。このトリグリセリドの中に取り込まれたカプリル酸(8:0)及びトリグリセリドの中に残存しているアラキドン酸(20:4)をGC分析により測定し、固定化酵素の活性を求めた。GC分析値のカプリル酸の割合(脂肪酸組成での割合: mol%)を反応性(酵素活性)として、またGC分析値のアラキドン酸の割合(脂肪酸組成での割合: mol%)を特異性の残存として表1に示した。固定化したリパーゼはSUNGA25の1, 3位の脂肪酸をカプリル酸にエステル交換しているため、トリグリセリド中に残存しているアラキドン酸量はすなわちトリグリセリドの2位に結合したアラキドン酸量と考えられる。

表 1

固定化酵素担体	反応性	特異性の残存
	カプリル酸 (mol%)	アラキドン酸 (mol%)
SM-10	36.9	19.9
Dowex MARATHON WBA	44.5	18.5

この結果からDowex MARATHON WBAの優位性が示された。すなわちDowex MARATHON WBAはSM-10に比べ、長期反応後であっても反応性の低下が少なく、しかも位置特異性はSM-10と同等の値を示した。従って熱安定性についてもDowex MARATHON WBAが有効であることが

容易に推定される。

例 3

(アラキドン酸を25質量%含有する微生物油 (トリグリセリド95%以上含有) (SUNTGA25: サントリー (株)) とアラキドン酸を40質量%含有する微生物油 (トリグリセリド95%以上含有) (SUNTGA40S: サントリー (株)) を原料油脂とした場合の8A8の製造[酵素反応3回繰り返し処理])

SUNTGA25あるいはSUNTGA40S 28g、カプリル酸 56g、固定化リパーゼ (Rhizopus delemar リパーゼ、担体: Dowex MARATHON WBA) 4.8gを30℃で48時間、撹拌 (130rpm) して反応させた。固定化リパーゼを取り除いた反応油脂中には、エステル交換のときに切り出された原料油脂 (トリグリセリド) の1,3-位に結合していた脂肪酸と過剰の反応基質である中鎖脂肪酸が存在しており、アルカリ性ヘキサン抽出によってこれら脂肪酸を取り除くことで1回処理油脂を得た。得られた1回処理油脂 12g、カプリル酸24g、固定化酵素1.8gを30℃で48時間、撹拌 (130rpm) して反応させた。先と同様の処理により中鎖脂肪酸などを取り除くことで2回処理油脂を得た。さらに、得られた2回処理油脂3g、カプリル酸8g、固定化酵素0.6gを30℃で48時間、撹拌 (130rpm) して反応させた。先と同様の処理により中鎖脂肪酸などを取り除くことで3回処理油脂を得た。

SUNTGA25あるいはSUNTGA40Sを原料油脂とした場合の反応液の脂肪酸組成 (mol%) を表 2、3 に示す。

表 2 原料油脂 : SUNTGA25

	8:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3 ω 6	18:3 ω 3	20:3	20:4	22:0	24:0
原料油脂	-	14.89	6.15	13.90	23.81	2.10	2.29	2.95	23.47	1.70	3.40
1 回処理油脂	48.66	2.71	1.18	7.27	14.62	2.01	1.01	2.58	16.61	0.40	0.74
2 回処理油脂	58.72	0.91	0.38	6.25	12.90	1.81	0.81	2.38	14.13	0.10	0.23
3 回処理油脂	63.80	0.56	0.22	5.71	11.95	1.86	0.72	2.09	11.69	-	0.11

表 3 原料油脂 : SUNTGA40S

	8:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3 ω 6	18:3 ω 3	20:3	20:4	22:0	24:0
原料油脂	-	13.65	6.01	15.07	7.30	3.59	0.21	4.50	37.70	2.03	3.74
1 回処理油脂	45.46	2.48	1.16	8.16	5.51	3.31	-	3.82	26.16	0.50	0.79
2 回処理油脂	56.72	0.85	0.39	6.98	4.92	2.85	-	3.47	21.80	0.22	0.26
3 回処理油脂	60.75	0.51	0.21	6.45	4.68	2.69	-	3.25	19.29	0.14	0.11

トリグリセリドに結合する脂肪酸組成をmol%で表しているため、原料油脂の1,3-位の脂肪酸がすべてカプリル酸にエステル交換されれば、カプリル酸のmol%は66.6%となる。したがって、反応を繰り返すことでカプリル酸の割合を60%まで高めることができた。

例 4

(8A8の分析法)

1,3-位特異的リパーゼを利用し、原料油脂の1,3-位に結合する脂肪酸を中鎖脂肪酸にエステル交換する方法が魚油あるいはTGA-25 (SUNTGA25: サントリー (株)) を原料油脂とする反応が報告されている。しかし、いずれの報告においても例3に示した反応後得られた油脂 (トリグリセリド) の脂肪酸組成 (mol%) の変化で評価しており、目的とする1,3-位に中鎖脂肪酸、2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを分析するには至っておらず、発明が実施されたのかどうかを判断することは不可能であった。本例においては、本発明を明らかにするために、本発明の目的化合物のひとつである8A8を一例として、その分析法を示す。

8A8の分析法は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 並びにガスクロマトグラフィー (GC) を組み合わせて定量する。

[HPLC分析法]

カラム: 逆相カラム (Cosmosil 4.6 x 250 mm 5C18-MS)

溶媒: アセトン/アセトニトリル (1:1) 1 ml/min

分析時間: 55分

カラムオーブン温度: 40℃

検出器: 示差屈折計検出器 (セル温度40℃)

サンプル: 油脂 (トリグリセリド) をクロロホルムに溶解させた、5 μ l の10%溶液を注入

[GC分析法]

カラム：Frontier Ultra ALLOY UA-17-15M-0.1F(15m x 0.25mm x 0.1 μ m)

カラム温度：260℃-(1℃/分)-290℃-(10℃/分)-390℃ (5分)

分析時間：45分

注入口温度：310℃

検出器温度：370℃ (水素イオン化検出器)

キャリアガス：ヘリウム

線速度：40cm/分

サンプル：油脂 (トリグリセリド) をヘキサンに溶解させた、1 μ l の1%溶液を注入

原料油脂のトリグリセリドを、1,2,3-位に任意の脂肪酸が結合したものととしてXXX (X=任意の脂肪酸) で表すと、カプリル酸1個とエステル交換したトリグリセリドはXX8となり、カプリル酸2個とエステル交換したトリグリセリドは8X8となる。分子内転移により8X8の2-位の脂肪酸が分子内転移して88Xとなることもあり、その場合はさらにエステル交換が進行し、888となる。

HPLC分析の場合、トリグリセリドを分子種レベルで分離することができる (ただし、AAP (1,2-位のアラキドン酸、3-位にパルミチン酸が結合したトリグリセリド) とAPA (1,3-位のアラキドン酸、2-位にパルミチン酸が結合したトリグリセリド) の区別はつかず同じ保持時間を示す)。このHPLC分析により、888、8X8、XX8、XXXの割合を算出することができる。ただし、目的とする8A8は8X8の分子種団に存在するが、残念ながら8A8、8D8、8G8は同じ保持時間を示し分別することができない。

GC分析の場合、HPLC分析で分別できなかった8A8、8D8、8G8を分別することができる (さらに、8A8と88Aも分別することができる)。しかし、888、8X8、XX8は検出することができるが、XXXは分解に

より検出することができない。

したがって、HPLC分析法とGC分析法を組み合わせることによりトリグリセリド中の8A8の割合を算出することができる。

例3の3回処理油脂を分析すると、

	油脂中の8X8 の割合(mol%)	油脂中の8A8 (mol%)の割合
SUNTGA25を3回酵素処理した油脂	92.5%	18.9%
SUNTGA40Sを3回酵素処理した油脂	80.3%	27.5%

となる。

このように、8A8の分析法を得て、初めて本発明の意義を見出すことができる。

例5

(原料油脂をSUNTGA40Sとし、酵素反応温度40℃とした場合の8A8の製造)

SUNTGA40S 1g、カプリル酸 2g、固定化酵素 (Rhizopus delemar リパーゼ、担体: Dowex MARATHON WBA) 0.2gを40℃で48時間、攪拌(130rpm)して反応させた。固定化リパーゼを取り除いた反応油脂中には、エステル交換のときに切り出された原料油脂(トリグリセリド)の1,3-位に結合していた脂肪酸と過剰の反応基質である中鎖脂肪酸が存在しており、例3と同様の方法によってこれら脂肪酸を取り除くことで処理油脂を得た。得られた処理油脂の脂肪酸(mol%)を表4に示す。なお、例3のSUNTGA40Sを原料油脂とする1回処理油脂を反応温度30℃のコントロールとして示す。

表 4

	8:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3φ6	18:3φ3	20:3	20:4	22:0	24:0
温度30℃	45.46	2.48	1.16	8.16	5.51	3.31	-	3.82	26.16	0.50	0.79
温度40℃	51.77	1.93	1.22	3.85	6.86	2.32	-	2.78	26.57	0.61	1.30

温度を30℃から40℃にすることで、カプリル酸の置換が45.46%から51.77%に上昇し、反応性が高められた。

例 6

(アラキドン酸を45質量%以上含有する油脂 (トリグリセリド) の製造)

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) CBS754.68を用い、グルコース2%、食用大豆タンパク6%、KH₂PO₄ 0.3%、MgCl₂・6H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 0.05%、大豆油0.1%を含む培地 (pH 6.0) 1000Lを2000L通気攪拌培養槽に入れ、温度26℃、通気量1.0 vvm、攪拌80rpm、槽内圧1.0kg/cm² Gの条件で通気攪拌培養を開始した。培養1、2日目に5%グルコースを、培養3日目に4.5%グルコースを、培養4日目に1.5%グルコースを逐次添加した。さらに、培養3日目に温度を21℃に下げて培養を継続した。グルコースは培養7日目に枯渇し、培養を16日目まで継続した。16日間の培養でアラキドン酸の割合は61質量%に達し、生産量 (アラキドン酸換算) も12g/Lを維持した。なお、培養13日目にすでにアラキドン酸の割合は60質量%に達しており、培養の短縮は十分可能である。得られた菌体を濾過により回収し油脂抽出を行い、アラキドン酸を55質量%以上含有する油脂 (トリグリセリド) (以後「SUN TGA55」と称す) を得た。

例 7

(原料油脂SUNTGA55をとし、酵素反応温度40～41℃とした場合の8A8の製造[連続反応])

固定化酵素 (Rhizopus delemarリパーゼ、担体: Dowex MARATHON WBA) 10gをジャケット付きガラスカラム (1.8 x 12.5cm、容量31.8ml) に充填し、SUNTGA55とカプリル酸を1:2に混合した混合油脂を一定の流速でカラムに流し、連続反応を実施した。なお、カラム温

度は40～41℃とした。上記連続反応の流速と反応効率を得られた油脂中のカプリル酸とアラキドン酸のmol%で示す（表5）。

表 5

	8:0（カプリル酸）	20:4（アラキドン酸）
SUNGA55	0	57.00
流速（ml/h）	8:0（カプリル酸）	20:4（アラキドン酸）
2.2	53.82	30.03
3.9	52.06	31.51
5.6	46.87	36.69
8.4	42.48	40.17
12.6	36.69	44.10
17.6	31.24	47.04
26.4	25.27	49.38
38.7	20.03	51.21

表5の結果より、流速を3.5～5.5として92日間の連続反応を試みた。結果を表6に示す。

表 6

反応日数	8:0 (カプリル酸)	20:4 (アラキドン酸)
1	49.60	34.32
2	53.00	31.22
10	51.75	32.87
20	50.10	34.61
35	48.15	36.08
50	46.73	37.37
70	46.44	37.43
80	43.90	39.43
92	41.43	40.99

40～41℃の温度条件においても、急激な酵素活性の低下もなく、92日間の連続生産を達成した。

この連続反応で得た油脂を集めて92日目に、反応で切り出された脂肪酸並びに反応基質である中鎖脂肪酸を精密分子蒸留で取り除き、例4の方法により油脂中の8A8、888の割合を調べたところそれぞれ40.1mol%、7.31mol%に達していた。

例1で調製した別の固定化担体を利用した固定化酵素 (Rhizopus delemarリパーゼ、担体：セラミックス担体 (SM-10)) を使って同様の連続反応を実施したが、固定化酵素の熱耐性が弱く、反応開始30日目で得られた油脂中のカプリル酸のmol%は32.4%となった。なお、例4の方法により油脂中の888の割合を調べたところ11.6mol%に達していた。

したがって、高度不飽和脂肪酸の割合が高い油脂を反応原料として使用しても、耐熱性を有する本発明の固定化酵素を利用する限り、反応効率を下げることなく実用的な生産が可能となり、また、888の割合が明らかに低いことから、酵素の位置特異性も反応温度の

上げたにも関わらず、十分に保持されていることが明らかとなった。

例 8

(ジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸を含有する油脂(トリグリセリド)を原料油脂とし、酵素反応温度40~41℃とした場合の1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの製造[バッチ反応])

本発明者らは、ジホモ- γ -リノレン酸あるいは ω 9系高度不飽和脂肪酸を含有する油脂(トリグリセリド)の製造法を確立している。ジホモ- γ -リノレン酸を含有する油脂(トリグリセリド)については、特開平5-91887号公報に記載の方法にしたがって、アラキドン酸生産能を有し、かつ Δ 5不飽和化活性が低下した微生物〔例えば、突然変異株モルティエセラ・アルピナSAM1860(微工研菌寄第3589号)〕を利用して、 ω 9系高度不飽和脂肪酸を含有する油脂(トリグリセリド)については、特開平5-91888号公報に記載の方法にしたがって、 ω 9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物〔例えば、突然変異株モルティエセラ・アルピナSAM1861(微工研菌寄第3590号)〕を培養して、ミード酸を含有する油脂(トリグリセリド)に関しては、特開平10-57085号公報に記載の方法にしたがって、アラキドン酸性産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 Δ 12不飽和化活性が低下又は欠失し、かつ Δ 5不飽和化活性、 Δ 6不飽和化活性及び／又は鎖長延長活性の少なくとも一つが高められた変異株〔例えば、モルティエセラ・アルピナSAM2086(8生寄文第1235号、FERMP-15766)〕を培養することにより、8,11-エイコサジエン酸を含有する油脂(トリグリセリド)に関しては、特開平5-91886号公報に記載の方法にしたがって、 ω 9系高度不飽和脂肪酸

生産能を有する微生物を、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤を添加してさらに培養することにより得ることができる。

上記方法によって製造した、ジホモ- γ -リノレン酸を44質量%含有する油脂（以後「SUNTGD」と称す）1g、8,11-エイコサジエン酸を16質量%含有する油脂（以後「SUNTG20:2」と称す）1gあるいは5,8,11-エイコサトリエン酸を24質量%含有する油脂（以後「SUNTGM」と称す）1gと、カプリル酸 2g、固定化酵素（Rhizopus delemarリパーゼ、担体：Dowex MARATHON WBA）0.2gとを混合し、40℃で48時間、攪拌（130rpm）して反応させた。固定化酵素を取り除いた反応油脂中には、エステル交換のときに切り出された原料油脂（トリグリセリド）の1,3-位に結合していた脂肪酸と過剰の反応基質である中鎖脂肪酸が存在しており、例3と同様の方法によってこれら脂肪酸を取り除くことで処理油脂を得た。得られた油脂中の1,3-カプリロイル-2-ジホモ- γ -リノレノイル-グリセロール、1,3-カプリロイル-2-8,11-エイコサジエノイル-グリセロールあるいは1,3-カプリロイル-2-5,8,11-エイコサトリエノイル-グリセロールの割合はそれぞれ34%、14%あるいは26%に達した。

なお、本例においては、固定化酵素として、原料油脂4g、カプリル酸8g、上記固定化リパーゼ600mg、水240 μ lを用いて、例1と同様な方法で活性化したものを用いた。

例 9

（粉ミルクへの使用）

粉ミルク100gに、例7で得た8A8を40.1mol%含有するトリグリセリド0.3g混合することにより、アラキドン酸の吸収を高めた粉ミルクを調製した。

例 1 0

(脂肪輸液剤への使用)

例 7 で得た 8A8 を 40.1mol% 含有するトリグリセリド 400g、精製卵黄レシチン 48g、オレイン酸 20g、グリセリン 100g 及び 0.1N 苛性ソーダ 40ml を加え、ホモジナイザーで分散させたのち、注射用蒸留水を加えて 4 リットルとする。これを高圧噴霧式乳化機にて乳化し、脂質乳液を調製した。該脂質乳液を 200ml ずつプラスチック製バッグに分注したのち、121℃、20 分間、高圧蒸気滅菌処理して脂肪輸液剤とする。

例 1 1

(1,3-位特異的リパーゼの固定化におけるゲニピン架橋剤の使用)

イオン交換樹脂担体 (Dowex MARATHON WBA : ダウケミカル) 100g を、Rhizopus deleamar リパーゼ 12.5% 水溶液 (タリパーゼ粉末 : 田辺製薬 (株)) 80ml に懸濁、2 時間穏やかに攪拌した後、5 % ゲニピン水溶液 8ml を加え室温で 6 時間穏やかに攪拌を続けた。その後、240ml の冷アセトン (-80℃) を攪拌しながら徐々に加えて沈殿を形成させた。そして、この沈殿物を減圧下で乾燥させて固定化酵素を得た。

そして、SUNTGA40S 4g、カプリル酸 8g、上記固定化リパーゼ 600mg、水 240 μ l の配合割合で、を 30℃ で 48 時間、攪拌 (130rpm) しながら反応させた。反応終了後、反応液を取り除き、活性化された固定化酵素を得た。

例 1 2

(1,3-位特異的リパーゼの固定化におけるゲニピン架橋剤使用による耐熱性の強化)

例 1 と例 1 1 で得た固定化酵素 (Rhizopus deleamar リパーゼ、担

体：Dowex MARATHON WBA) 4.8g、SUNTGA40S 28g、カプリル酸 56g
を30℃で48時間、攪拌（130rpm）して反応させた。反応生成物から
反応油脂を取り除き、新たに上記と同じ基質を加え30℃、40℃、50
℃、60℃で480時間、攪拌（130rpm）して反応させた。

その後、反応生成物から反応油脂を取り除き、新たに上記と同じ
基質を加え30℃で48時間、攪拌（130rpm）して反応させた。

表 7

例 1 で得た固定化 Rhizopus delemar 酵素を各温度で480時間保持し
た後の8:0（カプリル酸）の変換率

保持温度	480時間保持前	480時間保持した後	活性保持率（％）
30	43%	54%	102
40	52%	52%	95
50	54%	48%	89
60	50%	33%	66

表 8

例11で得た固定化 Rhizopus delemar 酵素を各温度で480時間保持し
た後の8:0（カプリル酸）の変換率

保持温度	480時間保持前	480時間保持した後	活性保持率（％）
30	51%	50%	98
40	49%	50%	102
50	54%	50%	93
60	50%	44%	88

その結果驚くべきことに、ゲニピンで処理した固定化酵素は60
℃で480時間保持した後の活性は初期の88％を保持していた。

例 13

例 4 での分析結果から、アラキドン酸を25%含有するSUNTGA25（
サントリー（株）製）を原料とした場合、酵素反応後の油脂中の8A

8の割合は18.9%であった。さらにアラキドン酸を高濃度含有するSUNTGA40S（アラキドン酸40%含有トリグリセリド、サントリー（株）製）を原料にすると27.5%の8A8油脂を得ている。

酵素反応後の油脂中の8A8の割合を高める目的で、特に酵素の固定化について検討した。固定化に用いている担体はイオン交換樹脂（Dowex MARATHON WBA）の多孔質樹脂であるため、酵素の固定化時の負荷量にある程度の幅を持って変えることができる。そこで酵素を例1に準じて固定化する際、固定化する酵素の量を例1と同量、その2倍、その1/2量にして固定化酵素を調製した。そして各々の固定化酵素を使って、例2と同様に、SUNTGA40Sを4gとカプリル酸8gとの混合油脂を原料にして固定化酵素を各々0.48g加え、30℃で72時間攪拌（130rpm）して反応させた。

表9は固定化酵素中に含まれるリパーゼ含量と反応終了後の油脂中8A8の割合の関係を示したものである。例4では同じ原料のSUNTGA40Sを使い酵素反応を3回も繰り返して行っても、油脂中の8A8の割合は27.5%でしかない。一方、表9に示した固定化酵素（2倍量）では単回反応にも関わらず、油脂中の8A8の割合を38.9%にまで高めることができた。

表9

固定化酵素の酵素含量*	油脂中の8A8の割合 (mol%)
1 / 2	21.0
1	25.6
2	38.9

*：酵素含量は例1の固定化担体100gに対してタリパーゼ粉末10gを基準にして、その倍数で示した。

請 求 の 範 囲

1. 炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸を含有し、 ω 3系高度不飽和脂肪酸を含有しない原料油脂と中鎖脂肪酸類の混合物に、トリグリセリドの1, 3位のエステル結合に特異的に作用するリパーゼを作用させて、トリグリセリドの1位及び3位に中鎖脂肪酸が、2位に該高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含有する油脂を製造する方法において、多孔質であって、約100オングストローム以上の孔径を有するイオン交換樹脂担体に固定化されたリパーゼを用いることを特徴とする製造方法。

2. 原料油脂と中鎖脂肪酸類の混合物に固定化リパーゼを作用させて反応生成物を得た後、該生成物から固定化リパーゼを回収し、遊離脂肪酸を取り除いて反応油脂を得、次に該油脂に中鎖脂肪酸類を加え、これらに前回回収した固定化リパーゼを作用させて反応生成物を得る工程を繰り返して行うことを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

3. 固定化リパーゼを反応温度40℃以上で作用させることを特徴とする請求項1又は2に記載の製造方法。

4. 原料油脂中に存在する炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸の全量が、該油脂中の全脂肪酸に対して30質量%以上であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。

5. 炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸が、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸、炭素数が18以

上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸が、6,9-オクタデカジエン酸、8,11-エイコサジエン酸、5,8,11-エイコサトリエン酸である請求項1~4のいずれか1項に記載の製造方法。

6. 中鎖脂肪酸類が、遊離の中鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸の低級アルコールエステル又は中鎖脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂である、請求項1~5のいずれか1項に記載の製造方法。

7. 中鎖脂肪酸が、炭素数6~12個を有する脂肪酸である、請求項1~6のいずれか1項に記載の製造方法。

8. 炭素数6~12個を有する中鎖脂肪酸が、カプリル酸及び/又はカプリン酸である請求項7に記載の製造方法。

9. 原料油脂が、該油脂中の全脂肪酸に対して同一の高度不飽和脂肪酸を15質量%以上含有する油脂であることを特徴とする請求項1~8のいずれか1項に記載の製造方法。

10. 原料油脂が、該油脂中の全脂肪酸に対してアラキドン酸を25質量%以上含有する油脂であることを特徴とする、請求項1~8のいずれか1項に記載の製造方法。

11. 原料油脂が、微生物によって生産されるものであることを特徴とする、請求項1~10のいずれか1項に記載の製造方法。

12. 原料油脂が、モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物から抽出したものである請求項1~10のいずれか1項に記載の製造方法。

13. 上記モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物であることを特徴とする請求項12に記載の製造方法。

14. トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭

素数が 18 以上で二重結合が 2 以上の ω 9 系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも 1 種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを 30 ~ 90 mol % 含有する油脂又はトリグリセリド。

15. 2 位に結合している高度不飽和脂肪酸が、アラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、6, 9-オクタジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び 5, 8, 11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも 1 種の高度不飽和脂肪酸である請求項 14 記載の油脂又はトリグリセリド。

16. トリグリセリドの 1, 3 位に中鎖脂肪酸が、2 位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを 25 mol % 以上含有する油脂又はトリグリセリド。

17. トリグリセリドの 1, 3 位に中鎖脂肪酸が、2 位にジホモ- γ -リノレン酸が結合したトリグリセリドを 5 mol % 以上含む油脂又はトリグリセリド。

18. トリグリセリドの 1, 3 位に中鎖脂肪酸が、2 位に 5, 8, 11-エイコサトリエン酸が結合したトリグリセリドを 5 mol % 以上含む油脂又はトリグリセリド。

19. 請求項 14 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の油脂又はトリグリセリドを特別な栄養需要に応じて配合してなる食品組成物。

20. 前記食品組成物が、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児食品、妊産婦用食品又は老人用食品であることを特徴とする請求項 19 記載の食品組成物。

21. 請求項 14 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の油脂又はトリグリセリドを配合してなる動物用飼料。

22. 少なくとも 1 種の請求項 14 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の油脂又はトリグリセリドを含有し、場合により経口、腸内又は非経口投与に適した中性の担体を配合した治療用栄養食品。

23. 少なくとも1種の請求項14～18のいずれか1項に記載の油脂又はトリグリセリドを含有する医薬組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06702

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P7/64, C11C3/00, A23C11/04, A23K1/16, A23L1/30,
A61K31/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P7/64, C11C3/00, A23C11/04, A23K1/16, A23L1/30,
A61K31/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), MEDLINE (BIOSIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 63-297342 A (The Nisshin Oil Mills, Ltd.), 05 December, 1988 (05.12.88), & WO 88/09325 A	<u>14-23</u> 1-13
<u>Y</u> A	JP 08-214891 A (Osaka-Shi), 27 August, 1996 (27.08.96), (Family: none)	<u>1-13</u> 14-23
<u>Y</u> A	WO 96/21037 A (Martek Biosciences Corp.), 11 July, 1996 (11.07.96), & US 5658767 A & EP 800584 A1 & JP 10-512444 A	<u>12, 13</u> 1-11, 14-23
<u>X</u> Y	Yuji SHIMADA, Production of Functional Lipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids with Lipase., Foods & Food Ingred. J.Jpn(2000), No.184, pages 6 to 15	<u>14-23</u> 1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
09 September, 2002 (09.09.02)

Date of mailing of the international search report
01 October, 2002 (01.10.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06702

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Akiko KAWASHIMA, et al., Enzymatic Synthesis of High-Purity Structured Lipids with Caprylic Acid at 1,3-Positions and Polyunsaturated Fatty Acid at 2-Position., J.AM.Oil.Chem.Soc.(2001 Jun.), Vol.78, No.6, pages 611 to 616	<u>14-18</u> 1-13,19-23
<u>X</u> A	Yuji SHIMADA, et al., Enzymatic Purification of n-6 Polyunsaturated Fatty Acids., Kagaku to Kogyo (1999), Vol.73, No.3, pages 125 to 130	<u>12,13</u> 1-11,14-23
A	Yuji SHIMADA, et al., Enrichment of Arachidonic Acid: Selective Hydrolysis of Single-Cell Oil from Mortierella with Candida cylindracea Lipaze., JAOCS(1995), Vol.72, No.11, pages 1323 to 1327	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06702

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

unsaturated fatty acids having 18 or more carbon atoms and 3 or more double bonds and omega-9 highly unsaturated fatty acids having 18 or more carbon atoms and 2 or more double bonds" is obvious to a person skilled in the art because a "triglyceride having a medium-chain fatty acid in the 1- and 3-positions and having arachidonic acid as the 2-position fatty acid" is disclosed in documents JP 63-297342 A (The Nisshin Oil Mills, Ltd.) 1988.12.05 and WO 88/09325 A.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06702

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

A matter common to claims 1-23 is a "triglyceride having a medium-chain fatty acid bonded in the 1- and 3-positions and at least one highly unsaturated fatty acid bonded in the 2-position selected from the group consisting of omega-6 highly unsaturated fatty acids having 18 or more carbon atoms and 3 or more double bonds and omega-9 highly unsaturated fatty acids having 18 or more carbon atoms and 2 or more double bonds."

However, the "triglyceride having a medium-chain fatty acid bonded in the 1- and 3-positions and at least one highly unsaturated fatty acid bonded in the 2-position selected from the group consisting of omega-6 highly (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/06702

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12P7/64, C11C3/00, A23C11/04, A23K1/16, A23L1/30, A61K31/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12P7/64, C11C3/00, A23C11/04, A23K1/16, A23L1/30, A61K31/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST(JOIS), MEDLINE(BIOSIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	JP 63-297342 A(日清製油株式会社)1988. 12. 05 & WO 88/09325 A	<u>14-23</u> 1-13
<u>Y</u> A	JP 08-214891 A(大阪市)1996. 08. 27 (ファミリーなし)	<u>1-13</u> 14-23
<u>Y</u> A	WO 96/21037 A (MARTEK BIOSCIENCES CORP)1996. 07. 11 & US 5658767 A & EP 800584 A1 & JP 10-512444 A	<u>12, 13</u> 1-11, 14-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 09. 02

国際調査報告の発送日

01.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Yuji SHIMADA, Production of Functional Lipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids with Lipase., Foods & Food Ingred. J. Jpn(2000), No. 184, p. 6-15	<u>14-23</u> 1-13
<u>X</u> Y	Akiko KAWASHIMA, et. al., Enzymatic Synthesis of High-Purity Structured Lipids with Caprylic Acid at 1, 3-Positions and Polyunsaturated Fatty Acid at 2-Position., J. AM. Oil. Chem. Soc. (2001 Jun.), Vol. 78, No. 6, p. 611-616	<u>14-18</u> 1-13, 19-23
<u>Y</u> A	Yuji SHIMADA, et. al., Enzymatic Purification of n-6 Polyunsaturated Fatty Acids., 科学と工業(1999), Vol. 73, No. 3, p. 125-130	<u>12, 13</u> 1-11, 14-23
A 、	Yuji SHIMADA, et. al., Enrichment of Arachidonic Acid : Selective Hydrolysis of Single-Cell Oil from Mortierella with Candida cylindracea Lipaze., JAACS(1995), Vol. 72, No. 11, p. 1323-1327	1 - 2 3

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-23に共通の事項は、「トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド」であることである。

しかしながら、「トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位の脂肪酸がアラキドン酸であるトリグリセリド」は文献J P 63-297342 A(日清製油株式会社)1988.12.05 & WO 88/09325 A に開示されているから、「トリグリセリドの1,3位に中鎖脂肪酸が、2位に炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 6系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が2以上の ω 9系高度不飽和脂肪酸の群から選ばれた少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド」は、当該技術分野の専門家にとって自明である。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。